

MEMBRANE OF IMMOBILIZED ENZYME AND ENZYMIC ELECTRODE

Publication number: JP62228273

Publication date: 1987-10-07

Inventor: NAKANE NAOMI; SUGAMA AKIO; FUJITA SHOZO;
YASUDA HACHIRO; YAGISHITA AKIO

Applicant: FUJITSU LTD

Classification:

- international: **C12N11/06; G01N27/30; G01N27/327; G01N27/40;
C12N11/00; G01N27/30; G01N27/327; G01N27/40;**
(IPC1-7): C12N11/06; G01N27/30; G01N27/40

- european:

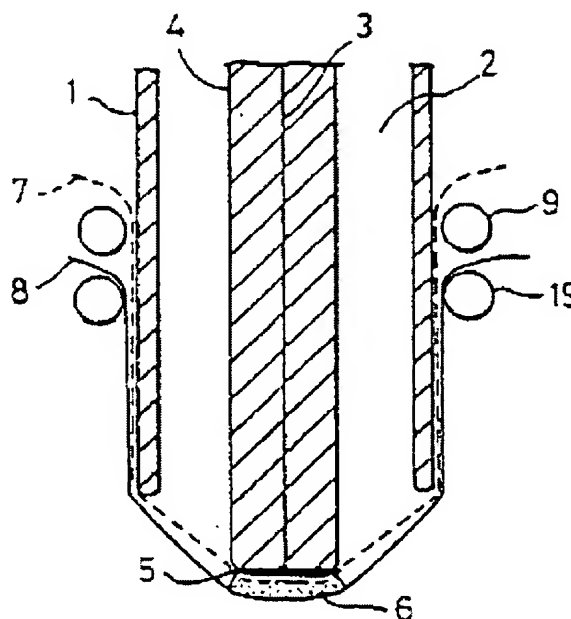
Application number: JP19860069773 19860329

Priority number(s): JP19860069773 19860329

Report a data error here

Abstract of JP62228273

PURPOSE:A membrane of an immobilized enzyme, obtained by linking an enzyme having a saccharide chain in the molecule to a carrier by a protein specifically linkable to the saccharide chain, hardly inactivating the enzyme and capable of being an enzymic electrode capable of accurate measurement with high reliability. **CONSTITUTION:**For example, an enzyme having a saccharide chain in the molecular structure such as glucose oxidase is linked to a carrier by using a protein capable of specifically linkable to the saccharide chain, e.g. lectin, to form a membrane of the immobilized enzyme 6, which is preferably used to cover a cathode 5 through an oxygen gas-permeable membrane 7.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-228273

⑮ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月7日

C 12 N 11/06

7133-4B

G 01 N 27/30

J-7363-2G

27/40

7363-2G

審査請求 未請求 発明の数 2 (全4頁)

⑭ 発明の名称 酵素固定化膜及び酵素電極

⑯ 特 願 昭61-69773

⑰ 出 願 昭61(1986)3月29日

⑱ 発 明 者	中 根	尚 美	川崎市中原区上小田中1015番地	富士通株式会社内
⑱ 発 明 者	菅 間	明 夫	川崎市中原区上小田中1015番地	富士通株式会社内
⑱ 発 明 者	藤 田	省 三	川崎市中原区上小田中1015番地	富士通株式会社内
⑱ 発 明 者	安 田	八 郎	川崎市中原区上小田中1015番地	富士通株式会社内
⑱ 発 明 者	柳 下	皓 男	川崎市中原区上小田中1015番地	富士通株式会社内
⑲ 出 願 人	富 士 通 株 式 会 社		川崎市中原区上小田中1015番地	
⑳ 代 理 人	弁 理 士 青 木	朗	外 3 名	

明 細 書

1. 発明の名称

酵素固定化膜及び酵素電極

2. 特許請求の範囲

1. 糖鎖を分子構造中に有する酵素を、その糖鎖に特異的に結合可能な蛋白質を用いて担体に結合させてなる酵素固定化膜。

2. 前記酵素がグルコースオキシダーゼであり、そして前記糖結合性蛋白質がレクチンである、特許請求の範囲第1項に記載の酵素固定化膜。

3. 糖鎖を分子構造中に有する酵素をその酵素の糖鎖に特異的に結合可能な蛋白質を用いて担体に結合させてなる酵素固定化膜を有している酵素電極。

4. 前記酵素がグルコースオキシダーゼであり、そして前記糖結合性蛋白質がレクチンである、特許請求の範囲第3項に記載の酵素電極。

5. 前記酵素固定化膜が電極のカソード上に酵素ガス透過性膜を介して被覆されている、特許請求の範囲第3項又は第4項に記載の酵素電極。

3. 発明の詳細な説明

(概要)

新規な酵素固定化膜及び該酵素固定化膜を使用した酵素電極が開示される。本発明によれば、特に、糖鎖をもつ酵素を特異的かつ強力に固定した、失活の少ない酵素固定化膜、そしてより正確かつ信頼性の高い計測が可能な酵素電極が提供される。

(産業上の利用分野)

本発明は、新規な酵素固定化膜と、該酵素固定化膜を使用した酵素電極に関する。本発明の酵素電極は、それを測定機器類と組み合わせて、化学や医学の分野におけるいろいろな計測方法に広く利用することができる。用途の一例として、グルコースの定量をあげることができる。

(従来の技術)

化学や医学の分野のみならず、環境、醗酵工業プロセス等の分野においても、各種の計測用センサーの主たる要素として酵素電極が用いられてい

ることは周知の通りである。酵素電極は、通常、例えば溶存酸素計として市販されているような酸素電極と、今本発明が問題としている酵素固定化膜とから構成される。酸素電極は、例えば第2図の原理図及び第3図の構成図を参照しながら説明すると、ガラス製の外管1に例えば塩化カリウムのようなアルカリの高濃度電解液2が収容されており、この電解液2中にはさらにカソードのリード線3を支持したガラス製カソード支持体4が浸漬されている。カソード5は、白金からなっていて、そのリード線3の先端に取り付けられている。銀アノード10は、ガラス製カソード支持体4の上部外周に巻き付けられている。白金カソード5は、例えばテフロン（商品名）のようなフッ素樹脂からなる酸素ガス透過性膜7で被覆され、さらにオリング9で固定されている。この酸素電極を酸素が溶存した溶液中に浸漬すると、溶存酸素が酸素ガス透過性膜7を透過して白金カソード5上に到着し、ここで還元されるために電流が得られる。この電流値は、溶存酸素濃度に比例する。こ

こで、図示の酸素電極のガス透過性膜7上に白金カソード5に対向させて酵素固定化膜（図示せず）を固定すると、酵素電極が製作される。酵素電極の一例としてのグルコースセンサ（電極）は、例えば、グルコースオキシダーゼを包括法、架橋法等の手法によって固定化して成形した膜を酵素固定化膜として使用することによって製作される。

（発明が解決しようとする問題点）

酵素電極の製作に用いられる酵素固定化膜は、上記したように、包括法、架橋法等の手法によって有利に固定化することができる。とりわけ有利に使用し得る架橋法は、例えばグルタルアルデヒドのような、蛋白質のアミノ基に作用する2個もしくはそれ以上の官能基を有する試薬（架橋試薬）を用いて、例えばアミノエチルセルロースなどのようなアミノ基を含む担体と酵素中のアミノ基の間を架橋して、酵素を固定化する方法である。しかし、この架橋反応を伴う方法の場合、酵素が失活しやすいという重要な欠点がある。

（問題点を解決するための手段）

本発明によれば、上述の問題点は、糖鎖を分子構造中に有する酵素を、その糖鎖に特異的に結合可能な蛋白質を用いて担体に結合させてなる酵素固定化膜、そしてこのような酵素固定化膜を有している酵素電極によって解決することができる。

本発明の酵素電極は、従来の技術の項で記載したものと同様に、支持体と、支持体内部に充填された電解液と、アノードと、カソードと、酵素電極用隔膜としてのガス透過性膜と、酵素固定化膜と、この膜を覆う透析膜とからなるのが一般的でありかつ好ましい。

本発明の実施において、酵素固定化膜の酵素がグルコースオキシダーゼでありかつ架橋試薬としての糖結合性蛋白質がレクチンであるのがとりわけ有用である。

（作用）

本発明では、レクチンのように糖結合特異性が高くかつ多数の結合部位を有する架橋試薬を使用

するので、反応が温和な条件の下で進行し、したがって、糖鎖をもつ酵素を失活を伴わずに強力に担体上に固定化することができる。

（実施例）

第1図に構成図で示されるようなグルコースセンサを、50mgのグルコースオキシダーゼ（II）（東洋紡製）及び10mgのコンカナバリンA（乾燥）（豊年製）を蒸留水に溶解し、得られた溶液の20mlをセルロース系透析膜（Size 36/32）（ユニオン・カーバイド製）の片面に滴下し、4℃で一夜反応させることによって製作した。得られた酵素固定化膜を酸素電極（石川製作所製、BO型）に装着した：図中の1はガラス外管であり、これにKC電解液2が充填してある。電解液2中に挿入したガラス製のカソード支持体4にはカソードのリード線3が埋封されており、リード線3の先端に白金カソード5がある。白金カソード5はテフロン（商品名）製酸素ガス透過性膜を介して酵素固定化膜6に接している。酵素固定化

膜6は透析膜8によって被覆されている。膜7及び8は、それぞれ、リング9及び19によって固定されている。

このグルコースセンサを用いて、試料溶液中のグルコース濃度とその時の出力電流値を測定した。検量線として第4A図及び第4B図に示すような結果が得られた。第4A図はグルコース濃度をリニアスケールで表示したものであり、第4B図は第4A図の低濃度領域を兩対数表示により拡大したものである。また、図の検量線Ⅰは定常状態になった時の出力電流変化 ΔI (μA)を、そして検量線Ⅱは単位時間当りの最大出力電流変化率 dI/dt ($\mu A \cdot S^{-1}$)を、それぞれ表わす。これらの結果から、本発明を適用したグルコースセンサの場合、酵素の失活が少なくかつ良好な応答が得られることが判る。

(発明の効果)

本発明によれば、固定される酵素の失活を防ぎ、酵素電極の構造及び小型化に応じて形状を制御で

きる、加工性の良い酵素固定化膜が簡単に得られる。

4. 図面の簡単な説明

第1図はグルコースセンサの構成図、

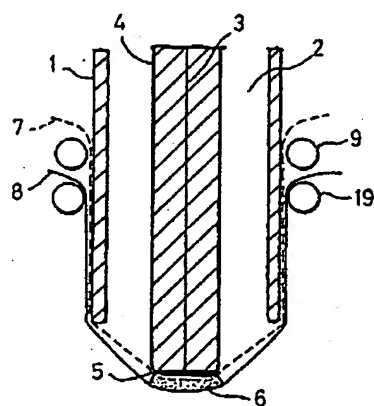
第2図は酸素電極の原理図、

第3図は酸素電極の構成図、

そして

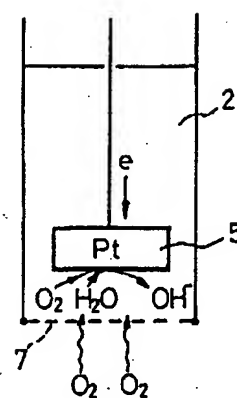
第4A図及び第4B図は、それぞれ、グルコース濃度と出力電流変化及び最大出力電流変化率の関係を示した検量線である。

図中、2は電解液、5はカソード、6は酵素固定化膜、7はガス透過性膜、そして8は透析膜である。



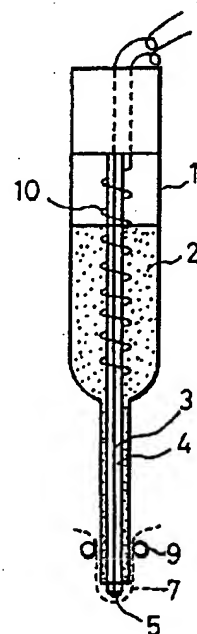
グルコースセンサの構成図

第1図



酸素電極の原理図

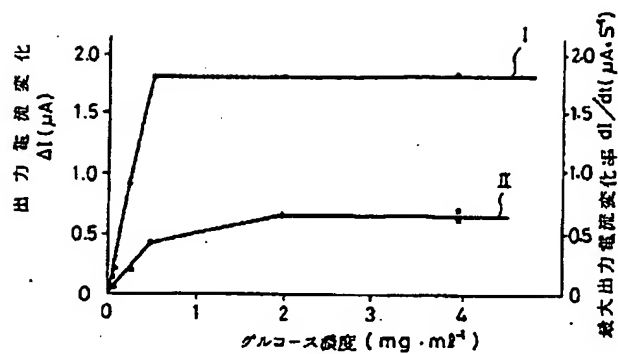
第2図



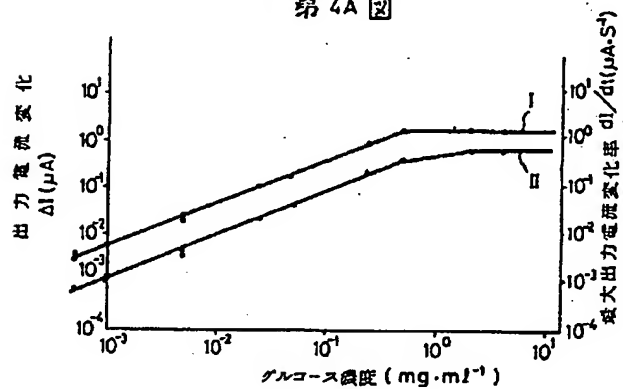
酸素電極の構成図

第3図

- 2 --- 電解液
- 5 --- カソード
- 6 --- 酵素固定化膜
- 7 --- ガス透過性膜
- 8 --- 透析膜



第4A図



第4B図 I…出力電流変化
II…最大出力電流変化率